DOI:10.11931/guihaia.gxzw201907041

无菌马尾松种子超低温保存技术研究

张晓宁[1,2]，黄宁[1,2]，覃子海[1,2]，姚瑞玲[1,2]，杨红[3,4]，刘海龙[1,2*]

（1. 广西壮族自治区林业科学研究院，南宁 530002； 2.广西特色经济林培育与利用重点实验室，南宁 530002；3.中国科学院昆明植物所，昆明 650201；4. 中国科学院大学，北京 100049）

摘要：建立马尾松种子超低温保存技术体系，为其种质资源的长期保存提供技术支持。利用液氮将不同含水量的无菌马尾松种子（27.4%、24.6%、22.7%、16.8%、15.8%、10.7%、7.5%、6.1%、4.8%、3.2%）进行超低温保存。结果显示：1.在3.2%-6.1%含水量范围内，经液氮冷冻保存后的发芽率随含水量升高逐渐升高，在含水量6.1%时，发芽率达到最大值91.33%；当含水量大于6.1%时，发芽率逐渐下降，尤其是当含水量大于15.8%时，发芽率迅速下降；在3.2%-7.5%含水量范围内冻存后发芽率达80%以上。2.冷冻、化冻方式影响超低温保存效果。种子无需低温预冷，直接投入液氮保存（快速冷冻）效果最好；室温空气化冻（缓慢化冻）较42 ℃水浴化冻发芽率高，且后者容易发生种皮炸裂现象。3.种皮对马尾松种子超低温保存过程起到保护作用，使其免受机械损伤，去掉外种皮的种子冻存后发芽率显著下降，且容易出现形态不正常的幼苗。4.超低温保存对马尾松种子萌发具有一定“刺激”作用，在最适含水量6.1%时，经超低温保存后种子的发芽率显著大于对照种子。总之，含水量、冷冻方法、化冻方法、种皮结构显著影响超低温保存效果，马尾松种子超低温保存的最优方法是将种子含水量控制在6.1%，直接投入液氮快速冷冻后室温空气缓慢化冻，冻后发芽率可达90%以上。

关键词：马尾松种子，超低温保存，干燥，含水量，安全含水量范围，发芽率

Cryopreservation of sterile *Pinus massoniana* seeds

ZHANG Xiongning[1,2], HUANG Ning[1,2], QIN Zihai[1,2], YAO Ruiling[1,2], YANG Hong[3,4], LIU Hailong[1,2*]

(1. *Guangxi Forestry Research Institute*, Nanning 530002, China; 2. *Guangxi Key Laboratory of Cultivation and Utilization of Characteristic Economic Forests*, Nanning 530002, China; 3. *Kunming Institute of Botany*, *Chinese Academy of Sciences,* Kunming 650201, China; 4. *University of Chinese Academy of Sciences,* Beijing 100049, China)

Abstract: To explore long term preservation of *Pinus massoniana* seeds through cryopreservation technology, aseptic seeds of *P. massoniana* with different water contents (WC) (27.4%, 24.6%, 22.7%, 16.8%, 15.8%, 10.7%, 7.5%, 6.1%, 4.8%, 3.2%) were cryopreserved in liquid nitrogen. Our results showed that: 1) The germination of cryopreserved seeds increased when the seed WC elevated from 3.2% to 6.1%, reaching the highest rate of 91.33% at the optimum WC of 6.1%;

基金项目：国家自然科学基金（31960311）；广西自然科学基金（2016GXNSFBA380224）；广西科技计划项目（桂科AD17195078）；“广西主要用材林资源高效培育与利用人才小高地”专项（桂财社函[2019]130） [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31960311); Guangxi Natural Science Foundation (2016GXNSFBA380224); Guangxi Science and Technology Program (17195078); Department of Human Resources and Social Security of GuangXi Zhuang Autonomous Region, China ([2019]130)]

作者简介：张晓宁（1985-）女，内蒙古乌兰察布市，硕士，助理研究员，主要从事林木种质资源离体保存技术研究，（E-mail）sflzxn@163.com。

*通信作者：刘海龙，博士，高级工程师，研究方向为林木遗传育种，（E-mail）50669291@qq.com。

However, seed germination decreased as WC further increased from 6.1% to 27.4%, in particular, with a rapid decline in germination of seeds with 15.8% or higher WC; There is a wide range of safe WC, within 3.2%-7.5%, the average germination rate reached above 80%. 2) In addition to WC, freezing and thawing methods also affected cryopreservation. Rapid freezing by directly immersing seeds into liquid nitrogen is better than pre-freezing at -20 ℃ prior to liquid nitrogen freezing; a slow air-thawing at room temperature gave a better germination result compared with a rapid thawing in a 42 ℃ water bath that caused seed episperm cracking. 3) The episperm also played an important role, which protected the seeds from the mechanical damage. The germination rates without episperm were significantly lower than those with episperm, and the abnormal seedlings were more observed when the episperms were removing. 4) At the optimum WC of 6.1%, cryopreserved seeds germinated better than those non-cryopreserved (control), indicating that cryopreservation may stimulate seed germination of *P. massoniana*. Collectively, our results showed that water content, freezing and thawing methods as well as the episperm structure can significantly affect cryopreservation of *P. massoniana* seeds; and the best method for cryopreservation of *P. massoniana* seeds is to directly freeze seeds with 6.1% WC using liquid nitrogen followed by a slow air-thawing at room temperature, by which the germination can reach above 90%. Results from this study may provide a rational for a long-term storage of *P. massoniana* seeds through cryopreservation.

Key words：*Pinus massoniana* seeds, cryopreservation, desiccation, water content, range of safe water content, germination percentage

马尾松（*Pinus massoniana* Lamb）为松科松属常绿高大乔木，是我国分布最广的优质乡土针叶及南方主要造林、绿化树种，广泛应用于用材、产脂、荒山造林及制浆造纸，在森林资源建设及生态发展中发挥着极其重要的作用(秦国峰和周志春,2012;杨章旗,2012)。广泛的地理分布和悠久的进化起源赋予马尾松种质资源丰富的遗传多样性，但由于自然环境恶化及人为破坏等因素，其天然林在演替过程中逐渐被常绿阔叶林和人工林替代，再加上单一人工林在应对病虫害及恶劣环境等自然灾害方面存在的局限性，其种质资源多样性正受到严重威胁（石娟等，2005；邓伦秀和李茂，2009）。因此开展对马尾松种质资源保存的研究就显得尤为迫切和必要。种子作为植物生命的载体，蕴含着丰富的遗传信息，是遗传改良、品种创新和良种生产重要的物质基础。种子的离体保存能在有限的空间最大限度的保存材料的遗传多样性，且不受病虫害及天气等影响，具有成本低、效率高、交流、运输方便等优点，是目前马尾松种质资源保存最主要的方式之一。

研究表明马尾松种子随着保存期限的延长，其品质不断下降，常温开放保存 3~4 年几乎全部丧失发芽力；在 2~4 ℃低温密闭保存可达 10 a 以上（秦国峰等，2017a）。虽然低温密闭条件延长了马尾松种子的保存期限，但相比其漫长的生命周期和从发芽到产生可用于繁殖下一代种子的时间间隔仍显短暂，从保障种质资源安全角度而言，延长其保存期限具有重要意义，而超低温保存正是目前为止实现种质资源长期保存的最佳途径。

种子的超低温保存是指将种子投入到液态氮（-196 ℃）或气态氮（-150 ℃）条件下进行保存，在此温度下，大多数植物的种子新陈代谢活动基本停止，劣变最大限度降低，理论上可以保存成百上千年（Basu, 2008; Walters et al., 2004），是目前为止集简便、实用、成本低、占地少于一体的一种长期保存种质资源的方法（Wilde, 2015）。超低温保存技术已成功应用于多种木本植物成熟种子或种胚的保存，如樱桃（宋常美等，2019）、樟树（马健等，2019）、黑杨（Marcin et al., 2015）、合欢、青杆（河英虎等，2013）、高山栲（卢玲等，2013）、红豆杉（程利红等，2012）。早期的研究认为马尾松种子最适保存温度是-18℃到-15℃（孙鸿有等，1994），并认为种子在-30 ℃储藏初期发芽率就开始大幅下降（喻方圆等，2006 a），谭俊（2009）也认为从种子的安全贮藏来看，马尾松种子并不适合在-25 ℃及以下的温度贮藏。喻方圆利用差式扫描量热仪证明马尾松种子在-24.826 ℃

的温度下结晶，细胞质中粗脂肪含量高，低聚糖与蔗糖比值低，决定了其难形成玻璃化状态，并推测这是马尾松种子不耐-30 ℃以下储藏的主要原因（喻方圆等，2006b）。

杨学军(2008)首次利用脱水干燥法将马尾松种子进行了超低温保存，在含水量为 4.3%时，获得 80%的发芽率，但主要针对含水量和冷冻保护剂对超低温保存效果的影响进行了研究，本研究将在此基础上，利用无菌种子为材料，系统研究了含水量、冷冻方式、化冻方式及种皮的保护作用等对冻存效果的影响，简化了马尾松种子超低温保存技术体系，提高了保存效率，确定了最适含水量和安全含水范围，并首次指出超低温保存对马尾松种子具有一定“刺激”作用，进一步验证马尾松种子超低温保存的可行性。为马尾松种子资源的长期保存提供了理论指导和技术支撑，也为其他林木种子的超低温保存研究提供参考。本试验利用无菌种子不仅消除了种子发霉对发芽率的干扰和影响，还可直接获得无菌幼苗用于后续研究。

1 材料与方法

1.1 种子质量特性的测定及含水梯度的建立

试验用马尾松种子于 2017 年 11 月采自广西藤县；试验用干燥箱：上海施都凯，BAO-150A；超净工作台：苏州净化 SW-CJ-2D；光照培养箱：杭州汇尔 GZH-0158；冷冻管：美国 Nunc；硅胶：上海新火；$KMnO_4$：郑州中天实验仪器有限公司；升汞：贵州省铜仁化工研究所。

参照《林木种子检验规程》(国家质量技术监督局，2000)要求测定千粒重、初始含水量和发芽率等种子质量特性。

发芽率的测定：将待测种子播种于含双层滤纸的培养皿，定期喷水，保持滤纸湿润。光照培养箱 27 ℃黑暗培养 5 d；第 6 d 开始，光照强度 2 000 lx，光照时间 8 $h\bullet d^{-1}$。根长等于种子长时记为发芽。发芽率(GP)=（发芽种子数/种子总数）×100%。4 个重复，每重复 100 粒。

初始含水量(ω0)的测定：采用低温烘干法（103 ℃烘干 16 h）测定，ω0=（鲜重-绝干重）/鲜重*100%。3 个重复，每重复 50 g。

含水梯度的获取：消毒后的种子采用浸种和硅胶干燥的方式获取 27.43%-3.2%的 10 个含水量梯度的种子，密闭于双层铝箔袋中 4 ℃保存备用。实际含水量（ω1）采用减重法计算，ω1=100%-[最初重量×(100%-相对含水量)]/最后重量。（消毒方式：流水冲洗 2 h，0.5% $KMNO_4$浸泡 0.5 h，无菌水冲洗 6 次，0.1%升汞消毒 5 min，无菌水冲洗 6 次。）

1.2 种子的超低温保存试验

1.2.1 不同含水量对冻存后发芽率的影响

取含水量分别为 3.2%、4.8%、6.1%、7.5%、10.7%、15.8%、16.8%、22.7%、24.6%、27.4%的马尾松种子装于 1.8 mL 冷冻管中直接投入液氮保存 24 h 后，室温自然化冻，随后将种子播于铺有三层无菌滤纸的培养皿中，封口，置于光照培养箱进行发芽试验，并测定冻存后发芽率。

1.2.2 冷冻方式对冻存后发芽率的影响

取含水量为 3.2%、4.8%、6.1%、10.7%、16.8%、22.7%、27.4%的 7 个梯度的种子装于冷冻管中进行如下操作：1.快冻法：直接投入液氮；2.缓冻法：经-20 ℃预冻 30 min 投入液氮；3.慢冻法：经-20 ℃低温预处理 24 h 后投入液氮。3 种冷冻方式统一在液氮保存 24 h 后，室温自然化冻，统计发芽率。

1.2.3 化冻方式对冻存后发芽率的影响

将上述 7 个含水量梯度的种子直接投入液氮，冻存后的材料从液氮中取出，设置室温空气化冻、42 ℃水浴化冻两种化冻方式各 5 min 后，将种子播于铺有 3 层无菌滤纸的培养皿，

封口，置于光照培养箱黑暗培养，记录冻存后发芽率。

1.2.4 种皮对冻存后发芽率的影响

取含水量为 27.4%、10.7%、6.1% 和 3.2%的种子，剥去种皮，装于 1.8 mL 冷冻管，直接投入液氮保存 24 h，室温空气化冻后，测定发芽率。

1.2.5 超低温保存对种子发芽率的影响

取含水量为 27.4%、10.7%、6.1%和 3.2%的种子装于 1.8 mL 冷冻管中直接投入液氮保存 24 h，室温空气化冻后置于含 3 层湿润滤纸的培养皿测定冻存后发芽率；对照不经液氮直接放入相同条件培养皿测定发芽率。

1.3 数据分析

试验设 3 个重复，每个重复 100 粒种子。采用 Microsoft Office Excel（2016）软件对实验数据进行统计分析和绘图。试验结果为 3 个重复的平均值±标准误。数据差异的显著性采用 SPSS 方差分析中的 Duncan 新复极差法进行估算。

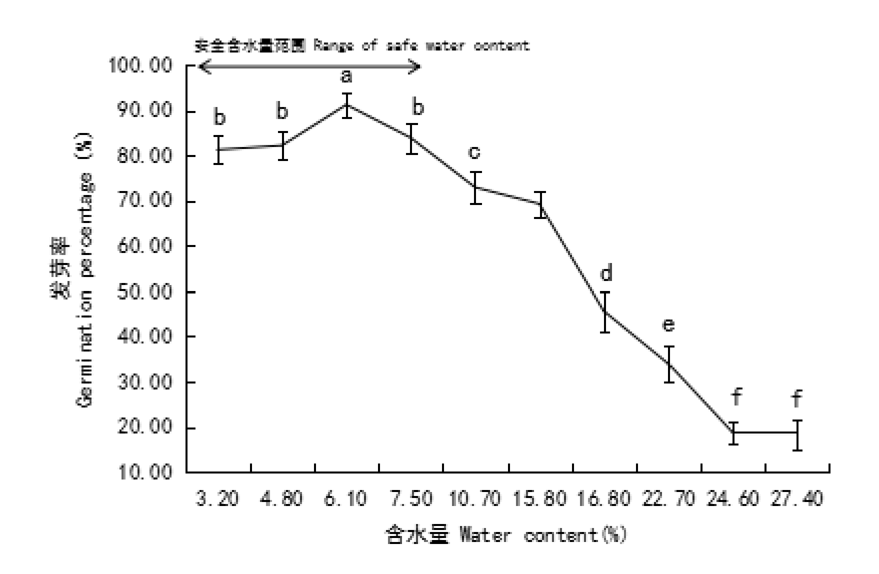
2 结果与分析

2.1 种子的质量特性及含水量梯度的建立

待测马尾松种子千粒重为 11.48 g，含水量为 9.56%，发芽率为 90.25%，利用浸种和硅胶干燥的方式获取含水量为 27.4%、 24.6%、22.7%、16.8%、15.8%、10.7%、7.5%、6.1%、4.8%、3.2%等 10 个梯度的种子，用以进行超低温保存等后续研究。

2.2 不同含水量对超低温保存后种子发芽率的影响

10 个不同含水量梯度的马尾松种子冻存后发芽率结果如图 1 所示，随含水量的下降，冻存后发芽率逐渐增高，直到含水量降为 6.1%时，发芽率达到最大值 91.33%，当继续干燥，发芽率不再上升，甚至有轻微的下降，6.1%为马尾松种子超低温保存的最适含水量。含水量为 6.1%-15.8%时，发芽率缓慢下降；当含水量大于 15.8%时，发芽率急剧下降。含水量从 15.8%增加到 16.8%时，发芽率从 69.33%迅速下降到 45.67%。马尾松种子适宜超低温保存的含水量范围很广，我们将冻后发芽率在 80%以上的含水量范围 3.2%-7.5%作为马尾松种子超低温保存的安全含水量范围。



注：不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

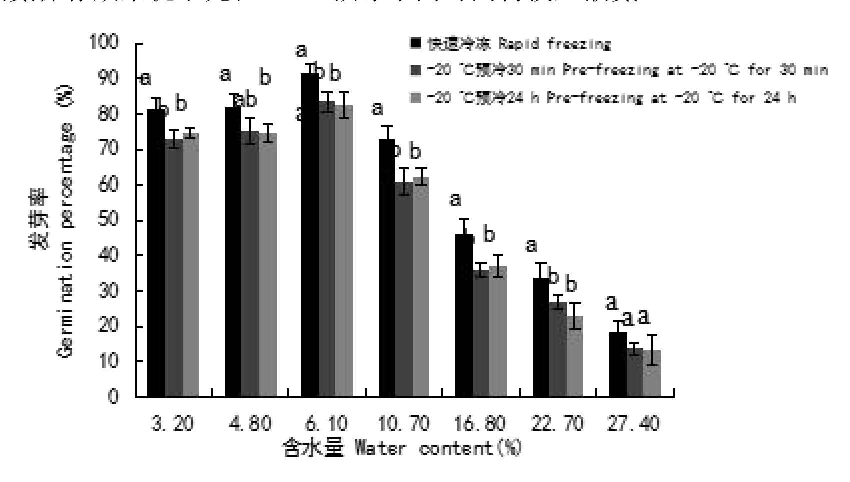
Note: Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

图 1 含水量对超低温保存后马尾松种子发芽率的影响

Fig.1 Effects of WC on germination percentage of cryopreserved *Masson* pine seeds

2.3 不同冷冻方式对超低温保存后种子发芽率的影响

不同冷冻方式对超低温保存效果的影响如图 2 所示，不同含水量的种子利用缓冻和慢冻法进行超低温保存后发芽率均不同程度的低于快冻法保存，结果表明将马尾松种子直接投入液氮保存效果优于先在-20℃预冻不同时间再投入液氮。



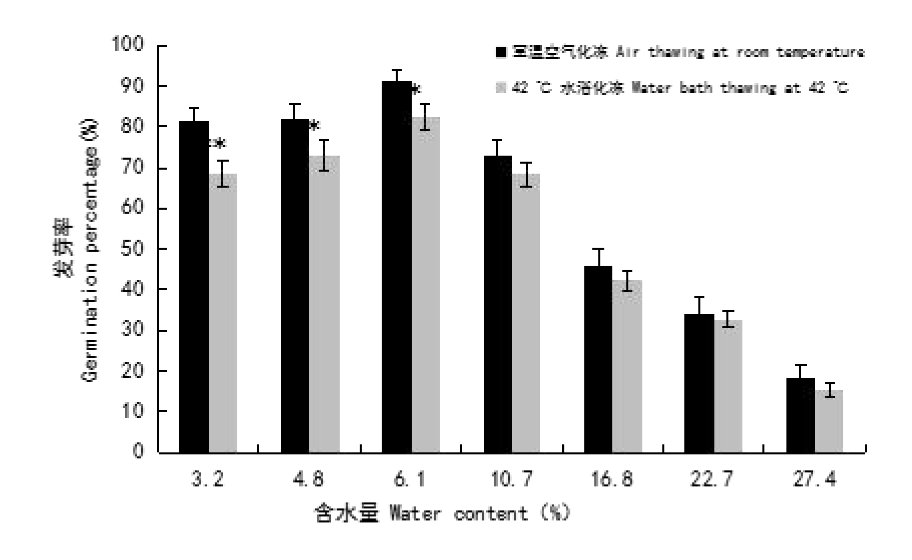
注：不同小写字母表示同一含水量不同冷冻方式之间在 0.05 水平差异显著。Note: Different lowercase letters indicate germination percentage with the same WC and different freezing methods are significant difference at 0.05 level.

图 2 冷冻方式对超低温保存后马尾松种子发芽率的影响

Fig.2 Effect of freezing methods on germination percentage of cryopreserved *Masson* Pine seeds

2.4 不同化冻方式对马尾松种子超低温保存后发芽率的影响

室温空气化冻和 42℃水浴化冻对马尾松种子超低温保存效果的影响如图 3，结果显示，室温空气化冻效果优于 42℃水浴化冻，含水量越小，两种化冻方式的差异越明显，采用室温空气化冻后不需要回湿直接置于含湿润滤纸的培养皿进行发芽试验。另外，研究发现 42℃水浴化冻会发生种子炸裂现象，致使种子受到机械损伤。



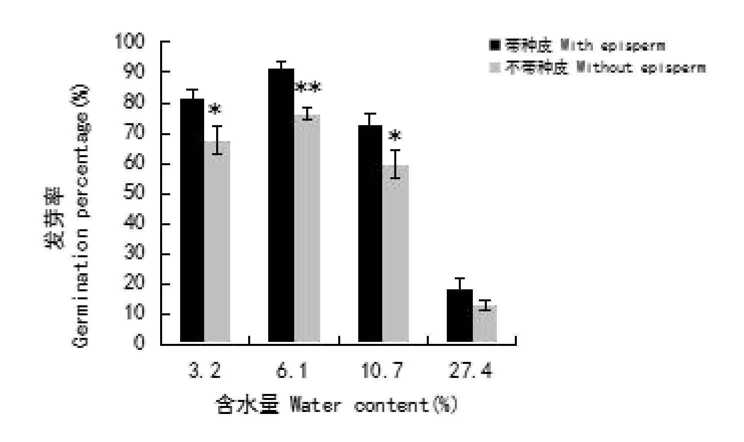
注：**/*分别表示同一含水量不同处理之间在 0.01 水平/0.05 水平差异显著。Note: **/* respectively indicate the different treatment with the same WC are significant difference at the 0.01/0.05 level.

图 3 化冻方式对超低温保存后马尾松种子发芽率的影响

Fig. 3 Effects of thawing methods on germination percentage of cryopreserved *Masson* pine seeds

2.5 外种皮对超低温保存效果的影响

外种皮对超低温保存效果的影响如图 4 所示，在 4 个含水量梯度下，带外种皮的种子保存后发芽率显著高于去掉外种皮的种子，但去掉外种皮种子冻存后露白时间要早于带外种皮的种子 1-2 d，可能是解除了种皮的机械限制作用的结果。保留外种皮的种子胚根先突破胚乳和种皮长出，接着下胚轴延伸，当下胚轴伸长到一定程度后，子叶初现，如图 6：A-B。去掉外种皮的种子发芽情况如图 6：C-G，其中图 6：C-D，为正常发育的种子，胚根先突破胚乳长出，如图 6：C；后下胚轴延长，子叶初现，如图 6：D。图 6：E-G 为发育顺序或幼苗形态异常的情况，子叶和下胚轴同时在种子两端生长，如图 6：E；子叶和下胚轴在胚根发育相反一侧先于胚根发育，如图 6：F；子叶和下胚轴在种子中间突破胚乳发育延长，如图 6：G。这种发育顺序异常或者说幼苗形态异常的现象的具体原因及机理机制有待更深入的研究。



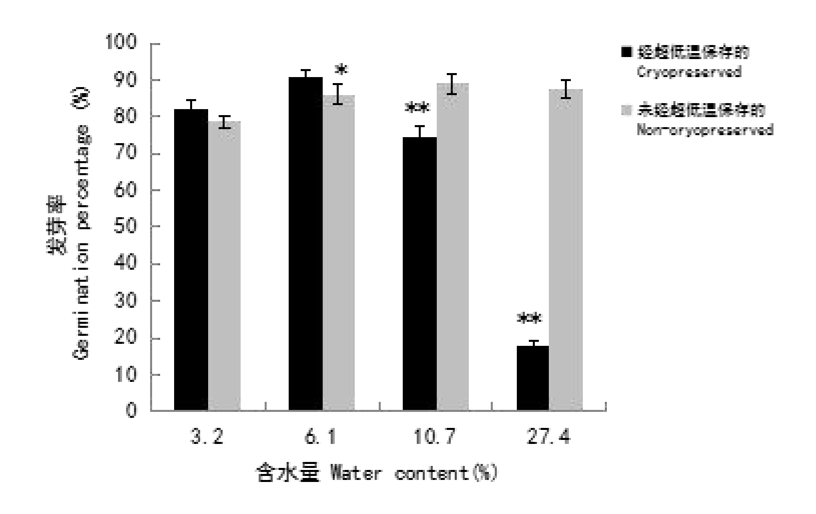
注：**/*分别表示同一含水量不同处理之间在 0.01 水平/0.05 水平差异显著。Note: **/* respectively indicate the different treatment with the same WC are significant difference at the 0.01/0.05 level.

图 4 种皮对超低温保存后马尾松种子发芽率的影响

Fig. 4 Effects of the episperm on germination percentage of cryopreserved *Masson* Pine seeds

2.6 超低温保存对种子发芽率的影响

含水量为3.2%，6.1%，10.7%，27.4%的马尾松种子经超低温保存前后发芽率如图5所示，其中当含水量为6.1%时，经超低温保存后发芽率为91%，显著高于该含水量下不经超低温保存的马尾松种子的发芽率86%，P = 0.049(P <0.05)。结果表明，在最适含水量6.1%时，超低温保存后对种子的发芽表现出了适度的“刺激”作用。



注：**/*分别表示同一含水量不同处理之间在 0.01 水平/0.05 水平差异显著。Note: **/* respectively indicate the different treatment with the same WC are significant difference at the 0.01/0.05 level.

图5 超低温保存对马尾松种子发芽率的影响

Fig.5 Effects of cryopreservation on germination percentage of *Masson Pine* seeds



图 6 带种皮种子（A-B）和去掉种皮种子（C-G）超低温保存后的发芽过程，其中 E-G 为去掉种皮种子不正常的发芽过程。

Fig. 6 Germination processes of cryopreserved *Masson pine* seeds with episperm (A-B) and without episperm (C-G), and abnormal germination without episperm (E-G)

3 结论与讨论

据报道林木种子离体保存资金投入约是其树上原位保存的1%（Li ＆ Pritchard, 2009），而作为离体保存方法之一的超低温保存，能在较小的空间以较低的成本极大的延长材料的保存时间（Trajković et al., 2019）。借助超低温保存技术，正常型林木种子的保存寿命有望延长到百年以上（Wang ＆ Simpson, 2006），毫无疑问超低温保存是目前为止最经济有效的长期保存种子资源的方法。种子的超低温保存一般是将种子投入液氮一定时间（几小时至几年）取出化冻后采用TTC染色法监测材料的生活力或直接监测发芽率判断该方法的适用性。马尾松种子在液氮保存24 h后化冻后发芽率为91.33%，本研究不仅为马尾松种子的长期保存

提供了高效可行的方法，为马尾松种质资源超低温库的建设提供了理论依据和实践指导，也为其他林木种子超低温保存研究提供了借鉴。

植物的超低温耐性与其脱水耐性、过冷却能力和玻璃化能力密切相关（Popova et al., 2012；文彬，2011）。根据脱水耐性及储藏能力种子被分为正常型、中间型、顽拗型3种类型。一般将能忍受脱水至含水量为0.05 g •g^{-1}dw并能在0 ℃以下低温保存的称为正常型种子，林木正常型种子成熟时或脱落时含水量一般小于20%-50%（Wang & Simpson, 2006）。据此可明确马尾松种子为正常型种子。正常性种子因为耐脱水，可以在冷冻前把自由水安全的移除，因此存在一个相对较宽的安全含水量范围。对于这类种子FAO/IPGRI推荐的适合长期保存的含水量为4%-7%，我们的结果与此相近。在3.2% -7.5%时，发芽率较高，达80%以上，因此认为3.2-7.5%为马尾松种子的安全含水量范围，在这个范围内既可以避免高含水量在零下低温时造成的胞内结冰损伤又可以避免含水量过低引起的脱水损伤。本研究当含水量从6.1%升到15.8%，发芽率缓慢下降仅从91.33%降到69.33%，含水量大于15.8%时，发芽率急剧下降，但直到含水量升为22.7%时，发芽率仍高达34%。这与杨学军的研究结果有些不同，虽然杨也指出当含水量超过15.6%时，马尾松种子超低温保存后发芽率急剧下降，但其结果显示当含水率大于21.6%时，发芽率仅为2%（杨学军，2008）。一般认为含水量是影响超低温保存效果的主要因素之一，但也有一些研究结果认为含水量对超低温保存效果的影响不显著（史锋厚等，2005），其原因可能是试验油松种子本身的含水量较低，已经在超低温贮藏的适宜含水量范围之内，再加上其实验设计的含水量梯度不大。本试验马尾松种子初始含水量为9.56%，并通过干燥和浸种扩大其含水量梯度为3.2% -27.4%，结果证明虽然马尾松种子超低温保存安全含水量范围较广，但含水量仍然对影响超低温保存效果有显著影响。

胞内结冰是影响超低温保存成功与否的关键因素之一。而玻璃化状态的形成理论上可以避免细胞内冰晶的形成（曾琳等，2014）。细胞内含物如可溶性糖、可溶性蛋白能提高植物的脱水耐性，降低过冷却点，增强玻璃化能力（文彬，2011）。如研究认为脂类对杉木种胚玻璃化状态的形成十分重要（喻方圆等，2006b）。顽拗性种子易受超低温伤害的主要原因是细胞代谢旺盛，线粒体、内膜系统丰富，液胞大而脂肪体，蛋白体和淀粉粒少（文彬，2011）。但相反也有研究认为富含油脂的正常性种子易受超低温伤害。一方面是贮油体与水分的相互作用会促进大冰晶的形成，导致电解质的泄露；另一方面是这类种子在冻存过程中容易因油体破裂导致生活力丧失（Vertucci, 1989）。马尾松种子富含油脂，其粗脂肪、粗蛋白质和总糖含量分别为44.8%、42.5%、7.1%（秦国峰等，2017b），但并未发现油脂对其超低温保存的不利影响，相反，在最适含水量6.1%时，经超低温保存后马尾松种子的发芽率较对照有所上升。这种超低温保存对种子发芽的“刺激”作用，在人参（商丽煌，2018）和一些野生花卉也有报道(王荷，2011)。马尾松种子内含物成分及含量与其耐受超低温保存的关系，以及超低温保存对其发芽率的“刺激”作用的机理机制有待进一步研究。

超低温保存对材料的伤害是一个累积的过程，冷冻阶段的结冰和化冻阶段的次生结冰都会导致机械损伤。因此一般采取快速冷冻（曾琳，2018）、快速化冻（Zhang, 2014）使材料迅速通过冰晶生长的温度危险区。但也有研究认为大块材料的快速升温可能因为受热不均匀发生机械伤害。本研究在含水量高的情况下，发现从液氮取出后，种子冻结成一整块儿，推测这可能是高含水量种子发芽率低的原因之一。本研究采用直接投入液氮的快速冷冻和室温空气缓慢化冻的方法保存效果最好， 42 ℃水浴快速化冻发芽率较低。同时观察到种子炸裂现象。此现象在合欢、祁州漏芦等种子(何英虎等，2013；王荷和刘燕，2011)的研究中也有报道，认为这种炸裂与种子含水量有关系，因为随含水量的降低，发生炸裂的种子比例增加。主要原因可能是种子承受不了冷冻和化冻过程中的巨大物理压力而导致（何英虎等，2013）。这种炸裂对种胚产生的机械损伤可能是其低发芽率的原因之一。有研究认为种壳能极大地提高种子在冷冻和化冻过程中所承受的物理压力，减缓温度变化对种皮的直接伤害而对种子起到保护作用，如在红水樱桃种子超低温保存研究中，无种壳种子污染率高，发芽率低，且苗畸形（宋常美等，2019）。本研究也认为种皮或种壳在超低

温保存中起到一定保护作用，去掉种皮的种子冻存后发芽率有所下降，且因为没有种皮的保护，胚根和子叶的发育受到了影响，也出现了形态不正常的幼苗。本研究通过降低化冻温度，缓和化冻时种子内部发生的热量交换有效的缓解了种子炸裂的问题。

总而言之，超低温保存是目前为止种子资源长期保存最有效的方法。种子的超低温耐性与其脱水耐性、过冷却能力和玻璃化能力密切相关，而这些能力又受到种子特性（如大小、顽拗性程度、含水量、种皮结构、内含物组分）以及冷冻、化冻方式、冷冻保护剂作用、冻后的复水、回湿、吸涨吸水及恢复培养等各种因素影响。本研究证实了含水量、冷冻方式、化冻方式及种皮的保护作用等对马尾松种子冻存效果的影响，确定了最适含水量和安全含水范围，初步建立了马尾松种子超低温保存技术体系，获得了高发芽率的长期保存方法，但其超低温保存保护和损伤的机理机制仍不明确，需进一步从生理生化和蛋白组学等方面开展研究。

参考文献：

BASU C, 2008. Gene amplification from Cryopreserved *Arabidopsis thaliana* shoot tips[J]. Curr Iss Mol Biol, 10(1-2): 55-60.

CHENG LH, DUAN XC, ZHANG ZQ, et al., 2012. Cryopreservation of Chinese *Taxus chinensis* seeds[J]. J NW A & F Univ (Nat Sci Ed), 40(2): 71-78. [程利红，段旭昌，张宗勤，等，2012. 中国红豆杉种子超低温保存技术研究[J]. 西北农林科技大学学报（自然科学版），40（2）：71-78.]

DENG LX, LI M, 2009. The Research Present Situation and Prospects on the *Pinus massoniana* Lamb. Plantation[J]. J Anhui Agric Sci, 37(7): 2968-2971. [邓伦秀，李茂，2009. 马尾松人工林研究现状及展望[J]. 安徽农业科学，37（7）：2968-2971.]

HE YH, FU YQ, LIU Y, 2013. Cryopreservation Seeds of *Albizzia julibrissin* and *Picea wilsonii*[J]. Seed, 32(3): 33-35, 40. [河英虎，傅伊倩，刘燕，2013. 合欢和青杆种子超低温保存研究[J]. 种子，32（3）：33-35，40.]

LI DZ, PRITCHARD HW, 2009. The science and economics of ex situ plant conservation[J]. Trends Plant Sci, 14(11): 614-621.

LU L, WANG HY, TU Y, et al., 2013．Cryopreservation of *castanopsis delavayi* seeds[J]．J Northeast Forest Univ, 41(7): 6-8, 14. [卢玲，王海英，图雅，等，2013. 高山栲种子的超低温保存[J]. 东北林业大学学报，41（7）：6-8，14.]

MA J, YE RY, ZHANG JH, 2019. Study on the Cryopreservation of *Cinnamomum camphora* Presl Mature Seeds[J]. J Anhui Agric Sci, 47(9): 170-172. [马健，叶润燕，张俊红，2019. 樟树成熟种子超低温保存研究[J]. 安徽农业科学，47（9）：170-172.]

MARCIN M, BEATA P P, TADEUSZ T, et al, 2015. Desiccation tolerance and cryopreservation of seeds of black poplar (*Populus nigra* L.), a disappearing tree species in Europe[J]. Eur J Forest Res, 134(1): 53-60.

POPOVA EV, HYUN KD, HEE HS, et al., 2012. Narrowing of the critical hydration window for cryopreservation of *Salix caprea* seeds following ageing and a reduction vigour[J]. Cryoletters, 33(3): 220-231.

QIN GF, ZHOU ZC, et al, 2012. Germplasm Resources of Chinese *Masson* Pine[M]. Beijing: China Forestry Publishing House: 18-21. [秦国峰，周志春，等，2012. 中国马尾松优良种质资源[M]. 北京：中国林业出版：18-21.]

QIN GF, ZHOU ZC, JIN GQ, et al., 2017a. Seed orchard of Masson pine. Beijing: China Forestry Publishing House: 304. [秦国峰，周志春，金国庆等，2017a. 马尾松种子园. 北京：中国林业出版社：304.]

QIN GF, ZHOU ZC, JIN GQ, et al., 2017b. Seed orchard of *Masson* pine. Beijing: China Forestry Publishing House: 59. [秦国峰，周志春，金国庆等，2017b. 马尾松种子园. 北京：中国林业出版社：59.]

SHANG LH, LEI XJ, SONG J, et al., 2018. Study on Cryopreservation of *Panax ginseng* split seeds[J]. Seed, 37(7): 68-70. [商丽煌，雷秀娟，宋娟等，2018. 人参裂口种子超低温保存技术研究[J]. 种子，37（7）：68-70.]

SHI FH, YU FY, SHEN YB, et al., 2005. Cryopreservation of Chinese pine seeds[J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed), 29(6): 119-122. [史锋厚，喻方圆，沈永宝，等，2005. 超低温贮藏对油松种子的影响[J]. 南京林业大学学报（自然科学版），29（6）：119-122.]

SHI J, LUO YQ, ZENG FY, et al., 2005. Impact of invasion of pine wood nematode on the niche of main populations in *Masson* pine community[J]. J Beijing For Univ, 27(6): 76-82. [石娟，骆有庆，曾凡勇，等，2005. 松材线虫入侵对马尾松林主要种群生态位的影响[J]. 北京林业大学学报，27（6）：76-82.]

SONG CM, WEN XP, LI QH, 2019. Cryopreservation of Seed of *Prunus pseudocerasu* L. 'Hongshui' by Vitrification[J]. Seed, 38(4): 156-158. [宋常美，文晓鹏，李庆宏. 红水樱桃种子玻璃化超低温保存[J]. 种子，38（4）：156-158.]

SUN HY, CAI KX, WU ZY, et al., 1994. Long-term Seed Storage of Eight Main Forest Species (*Cunninghamia lanceolata, Pinus massoniana*, etc.) in Southern China[J]. J ZheJiang For Coll, 11(3): 223-234. [孙鸿有，蔡克孝，吴祖映，等，1994. 杉木马尾松等南方8个主要造林树种种子长期贮藏[J]. 浙江林学院学报，11（3）：223-234.]

TAN J, 2009. Studies on physiological changes of *Cunninghamia Lanceolata* and *Pinus Massoniana* seeds during storage[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University: 1-88. [谭俊，2009. 杉木、马尾松种子贮藏过程中的生理变化研究[D]. 南京：南京林业大学：1-88.]

TRAJKOVIĆ M, ANTONIĆ D, CINGEL A, et al, 2019. Advancement in protocol for in vitro seed germination, plant regeneration and cryopreservation of *Viola cornuta*[J]. 3 Biotechnol, 9(1): 1-10.

VERTUCCI CW, 1989. Relationship between thermal transitions and freezing injury in pea and soybeans[J]. Plant Physiol, 90(3): 1121-1128.

WALTERS C, WHEELER L, STANWOOD P C, 2004. Longevity of cryogenically stored seeds[J]. Cryobiology, 48(3): 229-244.

WANG B S P, SIMPSON J D, 2006. Factors Affecting Tree Seed Storage[J]. J Nanjing Forest Univ (Nat Sci Ed), 30(1): 1-7.

WANG H, LIU Y, 2011. Study on Cryopreservation of 25 kinds of wildflower species seeds[J]. Seed, 30(4): 80-82. [王荷，刘燕，2011. 25种野生花卉种子超低温保存研究[J]. 种子，30（4）：80-82.]

WEN B, 2011. An introduction to cryopreservation of plant germplasm[J]. Plant Diver Resour, 33(3): 311-329. [文彬，2011. 植物种质资源超低温保存概述[J]. 植物分类与资源学报，33（3）：311-329.]

WILDE M, 2015. Cryopreservation modern insights[M]. New York, USA: Callisto Reference: 97.

YANG XJ, 2008. Studies on seed glass tansition and cryopreservation of three coniferous species[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University: 1-82. [杨学军，2008. 三个针叶树种种子玻 璃与超低温保存研究[D]. 南京：南京林业大学：1-82.]

YANG ZQ, 2012. Genetic improvement of key wood and resin properties of *Pinus Massoniana* Lamb [D]. Beijing: Beijing Forestry University:1-11. [杨章旗，2012. 马尾松材性与产脂性状遗传改良研究[D].北京：北京林业大学：1-11.]

YU FY, SHAO L, SHEN YB, 2006a. Studies on physiological and biochemical changes of Chinese fir and masson pine seeds during storage[J]. Sci Silva Sin, 42(12):137-142. [喻方圆，邵岚，沈永宝，2006a. 杉木、马尾松种子贮藏过程中生理生化变化研究[J]. 林业科学，42（12）：137-142.]

YU FY, SHAO L, CHEN SF. 2006b. A comparison on cytoplasmic vitrification and freezing point

of Chinese fir and masson pine seeds[J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed), 30(5): 1-4. [喻方圆，邵岚，陈淑芬，等，2006b. 杉木、马尾松种子细胞质冻结和玻璃化的比较[J]. 南京林业大学学报，30（5）：1-4.]

The State Bureau of quality and technical supervision, 2000. Forest seed inspection regulations (GB2772-1999)[S]. Beijing: China standard publishing house:10-15. [国家质量技术监督局， 2000. 林木种子检验规程 (GB2772-1999) [S]. 北京：中国标准出版社：10-15.]

ZENG L, HE MJ, CHEN K, et al., 2014. Study on cryopreservation of *Alpinia officinarum* Hance Seeds[J]. Chin Agric Sci Bull, 30(28):164-168. [曾琳，何明军，陈葵，等，2014. 高良姜种子超低温保存研究[J]. 中国农学通报，30（28）：164-168.]

ZENG L, WU Y, HE MJ, et al., 2018. Physiological and biochemical characteristics of *Alpinia oxyphylla* seeds after cryopreservation[J]. Guihaia, 38(4): 529-535. [曾琳，吴怡，何明军，等，2018. 超低温冷冻对益智种子生理生化特性的影响[J]. 广西植物，38(4)：529-535.]

ZHANG JM, ZHANG XN, LU XX, et al., 2014. Optimization of droplet-vitrification protocol for carnation genotypes and ultrastructural studies on shoot tips during cryopreservation[J]. Acta Physiol Plant, 36(12): 3189-3198.